

飼料添加用乳酸菌之篩選及特性分析⁽¹⁾

郭卿雲⁽²⁾ 涂榮珍⁽²⁾ 黃建榕⁽²⁾ 劉芳爵⁽³⁾ 陳希嘉⁽⁴⁾ 陳明汝⁽⁵⁾ 林幼君⁽²⁾⁽⁶⁾

收件日期：103 年 10 月 20 日；接受日期：104 年 5 月 8 日

摘 要

本研究之目的在於運用乳酸菌篩選與鑑定技術，自畜產動物體分離出具機能性潛力之乳酸菌，篩選出符合畜禽生產之高潛力乳酸菌菌株，未來供作飼料添加物以提升畜禽生產之效益。本研究由雞糞、雛雞糞、豬糞及雞腸道中，進行乳酸菌之分離純化，利用 API ZYM 套組來篩選含蛋白質水解或糖解酵素較強之菌株，並藉由 16S rDNA 定序比對輔以確認菌株身分，分析 18 株乳酸菌分離株包含 *Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus mucosae*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus salivarius*、*Pediococcus acidilactici*、*Pediococcus pentosaceus* 等，並綜合各項機能性分析，菌株 3-2 具有較佳耐膽鹽及抑菌能力；菌株 5-1、x-1d-2、x-1d-3' 具有較佳之酸及抗生素耐受性；菌株 C1W2'-2、C1W3'-2 具有較佳之膽鹽及抗生素耐受性，可混合不同優勢菌株進行後續發酵量產之試驗。

關鍵詞：乳酸菌、生物性飼料、機能特性。

緒 言

目前臺灣每頭母豬每年生產上市肉豬數為 11 – 13 頭，而且在哺乳與保育階段仔豬之死亡率達 30% 以上，嚴重影響我國豬肉之生產效率。造成仔豬疾病或死亡的常見因素包括傳染性胃腸病 (transmissible gastroenteritis, T.G.E.)、流行性下痢 (epidemic diarrhoea)、輪狀病毒 (rotavirus) 及其他 (鄧, 2014)。2013 年底至 2014 年初，在臺灣多個養豬場發生仔豬嚴重下痢，死亡率高達 90%，造成養殖場嚴重損失，以及豬價、豬肉售價上揚之情況。

抗生素雖具有預防疫病及促進豬隻的生長，不過卻容易讓豬肉產品有藥物殘留之疑慮，而且添加藥物亦會導致腸道有益菌遭到破壞和造成菌群抗藥性等後遺症。歐盟已在 2006 年全面禁止將抗生素做為畜禽之生長促進劑。德國根據動物用藥法，抗生素只能用在治療生病的動物，絕不能使用於促進動物的生長或是預防，違反規定者可被課以刑罰 (林, 2014)。為解決不使用抗生素做為畜禽之生長促進劑，則非藥物飼料添加物之添加與運用，將對國內畜禽生產模式扮演極具重要之角色。

學者研究指出，益生菌做為飼料添加物，可改善畜禽腸內微生物相的平衡。益生菌在消化道的功能包括 (1) 與致病菌競爭腸道營養素，(2) 與致病菌競爭腸內上皮細胞結合位置，(3) 產生對致病菌有害的化合物，(4) 生成可刺激免疫系統的化合物。因此，益生菌的應用，提供養殖業者於家畜禽使用抗生素的替代方案 (Cho *et al.*, 2011)。

乳酸菌通常是泛指能夠發酵碳水化合物，並以能產生乳酸為主要產物之微生物，又因乳酸菌在畜禽消化道中屬優勢菌之一，且其具有抑制腸道中有害微生物的生長，調節及建立腸道內菌相之特性。Chang *et al.* (2001) 從豬糞中篩選出耐酸、膽鹽及抗菌活性之 *Lactobacillus reuteri* BSA131，每日餵食仔豬 2×10^6 與 10^8 CFU/ 頭之冷凍乾燥菌體，結果顯示可提高豬隻活體增重及飼料轉換率，並顯著增加豬隻糞便中之乳酸菌菌數與降低腸內菌 (enterobacteria) 菌數。de Angelis *et al.* (2006) 自豬糞篩選出具有酸、膽鹽和熱耐受性以及能有效抑制 *Escherichia coli* ED36、*E. coli* PWD5 之乳酸菌株 *Lb. reuteri* 3S7 和 *Lb. plantarum* 4.1，並進一步進行豬隻餵飼試驗，結果發現可顯著降低豬隻糞中腸桿菌科 (Enterobacteriaceae) 之菌數 (de Angelis *et al.*, 2007)。因此，本試驗運用乳酸菌篩選與鑑定技術、菌株機能性項目測試、量產技術之研發以及代謝產物功能之分析等，篩選出符合畜禽生產之高潛力之乳酸菌株，生產衛生安全之畜產品。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2231 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(4) 行政院農業委員會。

(5) 國立臺灣大學動物科學技術學系。

(6) 通訊作者，E-mail：hiujj@mail.tlri.gov.tw。

材料與方法

I. 材料：雛雞雞糞（畜試推廣土雞之 1 週齡雛雞）、雞糞（土雞、白羽烏骨雞）、豬糞（畜試黑豬一號哺乳仔豬及生長豬，LD 肉豬哺乳仔豬及生長豬）及雞腸道（土雞）等由本所產業組提供。

II. 乳酸菌株之分離、鑑定及機能性分析

(i) 乳酸菌株之分離、篩選及鑑定

自本所產業組取得之雞糞、豬糞及雞腸道等試樣，進行乳酸菌株之分離、篩選作業。秤取 10 g 試樣以 90 g 之 0.85% 氯化鈉溶液混合於鐵胃袋攪碎均質後，取 1 mL 混合液移入 MRS 培養液中培養，再以劃線法於 MRS 培養基上分離單一菌落，純化後之乳酸菌株，依據光岡(1990)、Hardie (1986) 及 Kandler and Weiss (1986) 所述之分類標準進行鑑定。

1. 菌體形態之觀察，以革蘭氏染色法將菌株染色後，以電子顯微鏡觀察並照相做為篩選依據。
2. 醱發酵性狀測試：採用 API 50 CHL 套組，進行 49 種不同醱類之發酵測試，於 37°C 培養，並分別於 24 及 48 小時判讀。
3. 酵素活性測試：採用 API ZYM 套組，測試菌株 19 種酵素活性，並依其呈色深淺分為五級，顏色越深則其酵素活性越高。

4. 菌體 16S rDNA 定序及比對：

(1) 16S rDNA 萃取：使用 DNA 萃取純化使用商業套組 (blood and tissue genomic DNA extraction miniprep system, Viogene-Biotek Corp., Taipei, Taiwan) 進行萃取。試驗取 1 mL 解凍之菌液置於 1.5 mL 微量離心管中，在室溫下以 7,600 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後備用。隨後樣品以 160 μ L TE buffer 將沉澱菌塊完全懸浮，再加入 40 μ L 濃度為 100 mg/mL 的溶菌酶混合均勻，於 37°C 水浴槽反應 30 分鐘；接著加入 20 μ L Proteinase K 及 150 μ L FX buffer，經震盪混合 20 秒後，於 60°C 水浴槽反應 40 分鐘，再加入 150 μ L FX buffer 並上下倒置混勻。隨後樣品加入 200 μ L 異丙醇 (isopropanol) 移入置於收集管中純化 2 次，以 13,200 rpm 離心 2 分鐘；將管柱置於新的 1.5 mL 微量離心管上，加入 200 μ L 已預熱至 70°C 之無菌去離子水，靜置 5 分鐘後，再以 13,200 rpm 離心 2 分鐘，將最後所得之 DNA 樣品置於 -20°C 冰箱保存備用 (Yeung *et al.*, 2002)。

(2) 聚合酶鏈鎖反應與定序分析：為了解乳酸菌株菌群之分類，試驗選擇 16S rDNA 之保守性 DNA 序作為模板，針對乳酸菌選擇普遍性引子 8f 及 1512r (8f 引子序列：5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'，1512r 引子序列：5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG-3') 增幅 16S rDNA 全長基因片段，故菌體之 DNA 完成純化後，以聚合酶鏈鎖反應進行 DNA 片段增幅；試驗取 5 μ L 菌體 DNA 作為模板，並加入 0.5 μ L dNTPs 混合液 (N = A, T, C, G)、5 μ L 10X 聚合酶鏈鎖反應緩衝液、0.25 μ L DNA 聚合酶，於 94°C，30s、55°C，30s 及 70°C，30s 進行反應。將試驗所得產物進行定序分析，定序所得之結果使用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能於 Genbank 比對菌株之身分。

(ii) 耐酸性試驗：參考 Zavaglia *et al.* (1998) 方法，以 0.1 N HCl 溶液分別調整磷酸鹽緩衝液至 pH 值 2 及 3，取 100 μ L 活化菌液接種於 9.9 mL 之不同 pH 值之磷酸鹽緩衝液中，置於 37°C 下並分別於 0、1、2、3 及 4 小時取樣測殘存菌數。

(iii) 耐膽鹽試驗：參考 Toit *et al.* (1998) 方法，取 1 mL 活化菌液接種於含 0.3% 牛膽鹽與不含牛膽鹽之 MRS broth 中，置於 37°C 培養，並分別於 0、3、6 及 24 小時測定菌數。

膽鹽耐受性 (%) = (含 0.3% 牛膽鹽之菌數 / 不含牛膽鹽之菌數) \times 100

(iv) 抗氧化試驗：試驗使用硫氰酸鐵法 (ferric thiocyanate method) 測定乳酸菌之抗氧化能力。參考 Shahzadi *et al.* (2011) 方法，取 5 mL 亞麻油酸乳乳化溶液 (linoleic acid emulsion)，加入 0.1 mL 菌液及 5 mL 之 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0)，混合均勻後置於暗處之 37°C 培養 96 小時，每 24 小時取 0.1 mL 上述樣品混合液，依序加入乙醇、30% ammonium thiocyanate、0.02 M iron (II) chloride tetrahydrate，振盪均勻，靜置 3 分鐘後測定 OD₅₀₀ 之吸光值。抑制過氧化率 (inhibition of peroxidation %, IP%) = [1 - (樣品於 500 nm 的吸光值) / (未添加樣品之控制組於 500 nm 的吸光值)] \times 100。抑制脂質過氧化率愈高，表示抗氧化性愈強。

(v) 抑菌活性試驗：參考 Rammelsberg and Radler (1990) 方法，本試驗之目標病原菌株包括 *Escherichia coli* BCRC 10450、*Staphylococcus aureus* BCRC 10451、*Salmonella typhimurium* BCRC 10747 等 3 株，取測試濾紙浸於乳酸菌液，置於活化的目標病原菌培養基上，培養後量測紙錠周圍之抑菌圈直徑。

(vi) 抗生素敏感性試驗：修改自 Chang *et al.* (2001) 之實驗方法，取直徑 6 mm 之測試濾紙錠 (qualitative filter papers, Whatman, Springfield Mill, UK) 分別浸於 18 株 *Lactobacillus* spp. 之乳酸菌液中，再將濾紙錠置於已分別塗抹 *Escherichia coli* BCRC 10450、*Staphylococcus aureus* BCRC 10451 及 *Salmonella typhimurium* BCRC 10747 活化菌液之 Tryptic Soy agar 上，並同時以抗生素紙錠 (30 g doxycycline / 30 g nalidixic acid) 作為對照處理，培養 24 小時後測量紙錠周圍之抑菌圈徑長，試驗並以抑菌圈之大小作為菌株對於抗生素敏感性之判定。

(vii) 統計分析

試驗資料以一般線性模式 (general linear model) 進行變方分析 (SAS, 1996)，以最小均方平均值 (least square means) 比較各處理間之差異性，P 值小於 0.05 和 0.01 時，分別表示差異顯著及極顯著。

結果與討論

I. 乳酸菌株之分離、篩選及鑑定

自 1 週齡雛雞糞試樣中共篩選得到 11 株單一菌株，觀察其菌體形態皆為球狀或桿狀，且皆呈革蘭氏陽性反應，另以 API ZYM 套組檢測其 19 種酵素活性，其結果如表 1 所示，可知自雛雞糞分離得到之乳酸菌株其解脂酵素與糖解酵素較弱，但蛋白質水解酵素 (如 valine arylamidase、leucine arylamidase 等) 則活性較佳，可將原料或飼料中之蛋白質分解成低分子胜肽或胺基酸之應用潛力。另自雞糞、雞腸與豬糞分離之 27 株乳酸菌株測定其酵素活性與 API50 CHL 菌株鑑定，在 38 株篩選得到的乳酸菌，選擇其中酵素活性表現較強且菌株種別不同之 18 株乳酸菌株，分別為自雞糞分離之 1-1、2-3、3-2 及 5-1 菌株、自豬糞分離之 x-1d-2、x-1d-3'、x-3.4w-2、x-4w-1、LD-4w-1 及 LD-8w-1 菌株、自雞腸分離之 1-2A、2-1A、3-2A 及 4-2B、自雛雞糞分離之 C1W2'-2、C1W1'-2、C1W2'-2 及 C1W3'-2 等菌株進行後續之 16S rDNA 定序鑑定及其他機能性試驗分析。

表 1. 分離自 1 週齡雛雞糞之乳酸菌株酵素活性

Table 1. Enzyme activities* of lactic acid bacteria isolated from feces of 1-week-old chicks

No.	Enzyme	C1W1-1	C1W1-2	C1W2-1	C1W2-2	C1W3-1	C1W1'-1	C1W1'-2	C1W2'-1	C1W2'-2	C1W3'-1	C1W3'-2
1	Control	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	Alkaline phosphatase	ND	1	ND	1	ND	2	1	ND	ND	ND	ND
3	Esterase (C4)	3	2	ND	2	2	1	1	ND	ND	2	ND
4	Esterase lipase (C8)	4	2	ND	3	1	ND	1	ND	ND	2	ND
5	Lipase (C14)	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	Leucine arylamidase	4	3	4	4	3	4	4	4	4	3	4
7	Valine arylamidase	1	1	3	3	1	3	3	4	4	1	3
8	Cystine arylamidase	1	1	ND	1	1	1	2	1	ND	1	ND
9	Trypsin	ND	ND	ND	1	—	ND	1	1	ND	ND	ND
10	α -chymotrypsin	ND	ND	ND	1	—	ND	ND	1	ND	ND	ND
11	Acid phosphatase	1	1	ND	2	1	3	5	2	1	4	1
12	Naphthol-AS-B1-phosphohydrolase	1	1	1	2	ND	2	2	2	1	1	ND
13	α -galactosidase	ND	ND	ND	1	ND	1	2	ND	ND	ND	ND
14	β -galactosidase	ND	ND	ND	2	ND	3	2	2	ND	ND	ND
15	β -glucuronidase	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	α -glucosidase	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
17	β -glucosidase	ND	ND	ND	2	ND	ND	1	1	ND	ND	1
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
19	α -mannosidase	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	α -fucosidase	ND	ND	ND	1	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND

* Number 0, 1, 2, 3, 4 and 5 indicate the concentration of 0, 5, 10, 20, 30 and above 40 nmol, respectively. ND, not detected.

本試驗採用 API50 CHL 套組以菌株之碳水化合物代謝特性作為菌種鑑定之結果 (Ozgun and Vural, 2011)，然乳酸菌株種類繁多，此生化套組僅可鑑定 52 種乳酸菌，又動物腸道及糞便中常被檢出之 *L. reuteri*、*L. johnsonii* 及 *L. mucosae* 等並不在此套組之比對資料庫中，容易造成結果誤判，故另以 16S rDNA 定序與 GenBank 資料庫序列比對，方可確知所獲之菌株身分 (Korhonen *et al.*, 2007)。18 株乳酸菌之 API 鑑定結果與 16S rDNA 定序比對結果相較如表 2 所示，僅有 3 株乳酸菌 (C1W1'-2、C1W2'-2 及 C1W3'-2) 兩者所得之鑑定結果相符，其餘 15

株乳酸菌多為 *L. reuteri*、*L. johnsonii* 及 *L. mucosae*，故 API50 CHL 套組之結果應僅供作為菌株碳水化合物利用能力之參考，菌株之身分確認應以 16S rDNA 定序比對所得結果為主 (Marroki *et al.*, 2011)。

表 2. 乳酸菌株之 API50 CHL 套組及 16S rDNA 定序菌種鑑定結果

Table 2. The identification of lactic acid bacteria by API50 CHL kit and 16S rDNA sequencing

Strain No.	Identification according to API profiles	Identification according to 16S rDNA sequencing		
		Closest relative	Identity	Accession number
1-1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%	FJ386491.1
2-3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	CP000705.1
3-2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	CP000705.1
5-1	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	CP000705.1
1-2A	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	96%	CP000705.1
2-1A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%	FN298497.1
3-2A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	CP000705.1
4-2B	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	97%	EU728797.1
x-1d-2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%	FN298497.1
x-1d-3'	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	99%	FN298497.1
LD-4w-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	99%	CP000705.1
LD-8w-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	100%	CP000705.1
x-3.4w-2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	99%	NR_024994.1
x-4w-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	96%	NR_024994.1
C1W2-2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	99%	CP000423.1
C1W1'-2	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%	AY137589.1
C1W2'-2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	100%	AJ305320.1
C1W3'-2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	100%	CP000422.1

過去文獻對於乳酸桿菌之分析，Pidoux *et al.* (1990) 以 API 50 CHL 商業套組進行鑑定並與資料庫比對，並利用 DNA-DNA 雜合反應與標準菌株 (type strain) 進行雜合，結果發現其中 2 菌株於 API 系統資料庫比對達 99.9% 相符之 *L.b. casei subsp. casei* 卻與 *L.b. casei* 之標準菌株只有 9% 和 11% 相符，且而與 *L.b. paracasei subsp. paracasei* 有較高之符合度 (54% 和 48%)；另 1 株 *L.b. brevis* 也有相同的情形，其與 API 系統資料庫比對之相似度為 79%，但與標準菌株間僅有 7%，卻和 *L.b. hilgardii* 之標準菌株有高達 88% 相似，顯示同種中親緣相近之菌株間，若有相似之生化代謝表現，易造成僅以此作為依據之菌種鑑別度下降。

II. 耐酸性試驗

依據 Kim *et al.* (2007) 方法計算乳酸菌於不同培養時間之耐酸能力，於 pH 2 及 pH 3 耐受條件下之菌體存活率分別列於表 3 及表 4，可知本試驗所篩選之多數乳酸菌對於 pH 3 之酸性環境下較不敏感，有 16 株分離菌株在 4 小時後之菌數減少在 1 log CFU/mL 以內，初活菌數由 10^6 CFU/mL，至 4 小時後仍有 $10^5 - 10^6$ CFU/mL；但於 pH 2 條件時則會造成菌體大量且快速死亡，尤其菌株 1-1、1-2A、x-3.4w-2、C1W2-2、C1W2'-2 及 C1W3'-2 於 pH 2 處理 1 小時後幾乎完全死滅，而以菌株 2-3、5-1、x-1d-2、x-1d-3' 及 LD-4w-1 之耐酸能力較佳，於 pH 2 處理 4 小時後菌數下降 1 - 2 log CFU/mL 初活菌數由 10^6 CFU/mL，至 4 小時後仍有 $10^4 - 10^5$ CFU/mL。

III. 耐膽鹽試驗

膽鹽耐受性被認為是乳酸菌能在小腸中存活的必要特性之一 (Saarela *et al.*, 2000)。本試驗篩選菌株於不同培養時間之膽鹽耐受性結果如表 5 所示，可知隨著培養時間的延長，菌株對於膽鹽之敏感性增加致使死亡率提升；菌株 2-1A 於培養 3 小時之膽鹽耐受性最佳 (76%) 之菌株，初活菌數為 4.6×10^7 CFU/mL，至 3 小時後仍有 3.0×10^7 CFU/mL；然培養至 24 小時後則以菌株 3-2 之耐受性最佳 (30%)，初活菌數為 1.0×10^7 CFU/mL，至 3 小時後仍有 3.0×10^6 CFU/mL，其次菌株 2-3、3-2A、C1W2'-2 及 C1W3'-2 之耐受性介於 2 - 5%，其餘菌株則對膽鹽較為敏感，尤其是 LD-8w-1 對膽鹽幾無耐受性。

IV. 抗氧化試驗

呼吸空氣之氧化過程中，所衍生出之體內自由基，為活性強、具有未配對的電子，它們會攻擊不飽和脂肪

酸的生物膜，導致膜脂質過氧化作用，與衰老，癌變和動脈粥樣硬化等有關 (Shahzadi *et al.*, 2011)。本試驗篩選之乳酸菌株於不同培養時間之抑制過氧化率結果如表 6 所示，抑制脂質過氧化率愈高，表示抗氧化性愈強。試驗所測試之 18 株乳酸菌在 24 小時之抑制過氧化率皆可達到 70% 左右，於 48 小時則可達到 80% 以上且各菌株間抗氧化能力無顯著差異，除了菌株 3-2 之抗氧化能力不再隨時間變化外，其餘菌株培養至 72 小時可達到最高之抑制過氧化率結果約為 90%，而培養至 96 小時則抑制過氧化率下降至 82 – 87% 之間。

表 3. 乳酸菌在 pH 2 磷酸鹽緩衝液中於不同培養時間之存活率 (%)

Table 3. The survival rate (%) of lactic acid bacteria in PBS buffer with pH 2 after different incubation time

Strain No.	Percentage of survival				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
1-1	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-3	100.00	77.14	68.57	6.71	6.86
3-2	100.00	66.10	64.41	0.75	0.25
5-1	100.00	88.24	76.47	4.71	2.35
1-2A	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2-1A	100.00	13.53	17.05	1.14	0.65
3-2A	100.00	4.50	0.00	0.00	0.00
4-2B	100.00	39.17	0.00	0.00	0.00
x-1d-2	100.00	96.18	85.99	10.70	9.87
x-1d-3'	100.00	61.06	33.63	3.10	1.59
LD-4w-1	100.00	61.11	23.06	2.36	1.67
LD-8w-1	100.00	85.23	81.82	21.59	0.00
x-3.4w-2	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
x-4w-1	100.00	14.90	10.39	1.09	0.13
C1W2-2	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C1W1'-2	100.00	4.00	1.93	0.17	0.00
C1W2'-2	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C1W3'-2	100.00	0.10	0.05	0.01	0.00

表 4. 乳酸菌在 pH 3 磷酸鹽緩衝液中於不同培養時間之存活率 (%)

Table 4. The survival rate (%) of lactic acid bacteria in PBS buffer with pH 3 after different incubation time

Strain No.	Percentage of survival				
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
1-1	100.00	80.22	49.45	21.98	14.29
2-3	100.00	98.11	83.02	77.36	66.04
3-2	100.00	96.74	60.87	58.70	57.61
5-1	100.00	78.13	76.56	79.69	70.31
1-2A	100.00	94.66	72.82	60.68	53.40
2-1A	100.00	70.00	48.00	37.00	26.00
3-2A	100.00	96.55	86.21	82.76	58.62
4-2B	100.00	94.29	90.00	60.71	57.86
x-1d-2	100.00	97.82	35.37	24.89	20.96
x-1d-3'	100.00	83.06	43.72	33.88	32.24
LD-4w-1	100.00	83.46	82.05	79.49	76.92
LD-8w-1	100.00	94.12	82.35	76.47	35.29
x-3.4w-2	100.00	25.75	20.00	15.25	12.50
x-4w-1	100.00	82.66	66.13	49.19	35.08
C1W2-2	100.00	84.55	64.23	56.91	44.72
C1W1'-2	100.00	93.55	74.19	5.71	2.23
C1W2'-2	100.00	71.43	59.29	48.93	33.21
C1W3'-2	100.00	69.09	29.09	9.82	6.73

表 5. 乳酸菌於不同培養時間之膽鹽耐受性

Table 5. Bile tolerance of lactic acid bacteria under different incubation time

Strain No.	Percentage of survival			
	0 h	3 h	6 h	24 h
1-1	90.00	29.41	8.81	0.04
2-3	82.49	71.00	16.24	2.15
3-2	86.19	55.91	50.00	30.00
5-1	44.92	33.43	5.26	0.64
1-2A	12.50	0.37	0.18	0.01
2-1A	90.91	76.67	10.16	0.59
3-2A	12.50	4.76	1.10	5.80
4-2B	49.81	35.36	4.38	0.49
x-1d-2	1.93	0.24	0.22	0.15
x-1d-3'	52.33	40.00	4.51	0.22
LD-4w-1	55.56	50.00	4.55	0.00
LD-8w-1	0.13	0.89	0.13	0.00
x-3.4w-2	42.11	22.60	7.03	0.47
x-4w-1	54.55	1.69	0.23	0.00
C1W2-2	0.24	0.01	0.01	0.01
C1W1'-2	7.36	0.87	1.26	0.41
C1W2'-2	35.26	7.92	6.08	2.49
C1W3'-2	53.84	20.40	8.37	2.54

表 6. 乳酸菌於不同培養時間之抑制過氧化率

Table 6. Inhibition of peroxidation from lactic acid bacteria under different incubation time

Strain No.	Percentage of survival				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1-1	0.00	72.60	83.81	90.59	85.42
2-3	0.00	69.83	83.94	92.75	86.44
3-2	0.00	72.12	83.42	83.33	82.92
5-1	0.00	71.03	83.94	92.44	86.20
1-2A	0.00	73.80	84.47	93.67	86.92
2-1A	0.00	73.32	84.21	92.59	87.34
3-2A	0.00	70.43	84.47	92.98	87.34
4-2B	0.00	72.84	83.62	93.06	87.63
x-1d-2	0.00	73.08	84.53	93.44	85.84
x-1d-3'	0.00	73.80	84.60	93.44	87.69
LD-4w-1	0.00	72.84	83.94	91.82	86.08
LD-8w-1	0.00	72.00	85.78	91.82	86.26
x-3.4w-2	0.00	74.04	82.50	89.66	84.05
x-4w-1	0.00	75.00	85.12	91.82	85.36
C1W2-2	0.00	70.19	82.37	89.20	84.47
C1W1'-2	0.00	67.19	81.85	88.12	82.97
C1W2'-2	0.00	72.00	81.19	87.35	82.74
C1W3'-2	0.00	70.43	82.11	87.35	83.21

V. 抑菌活性試驗

18 株分離乳酸菌之發酵上清液之抑菌能力結果如表 7 所示，菌株 3-2 之抑菌能力最佳，可同時抑制受試之三種指標病原菌，包括 *E. coli*、*S. aureus* 及 *S. typhimurium* 等；而菌株 3-2A、4-2B、x-1d-2、x-1d-3'、LD-8w-1 及 x-3.4w-2 之抑菌能力較弱，對於指標病原菌幾無抑制生長能力，由此實驗結果亦可發現即使是相同種別之菌

株，其抑菌能力差異甚大，可能由於部分菌株可分泌類細菌素 (bacteriocin-like) 物質，因而具有抑制革蘭氏陽性和陰性病原菌之能力 (de Angelis *et al.*, 2006)。

Taheri *et al.* (2009) 由雞隻之嗦囊、迴腸及盲腸篩選出乳酸菌，觀測其發酵上清液對 *S. typhimurium*、*S. Enteritidis* 及 *E. coli* O78: K80 之抑制能力，結果顯示病原菌之抑制能力可隨著上清液 pH 值之下降而增加。Oyetayo (2004) 亦發現由豬隻糞便中所篩選之 *Lactobacillus fermentum* 2P 對 *E. coli* NCIB 86 具有抑制作用，然而對於 *S. aureus* NCIB 8588 則無抑制效果，此與本實驗中自豬隻篩選出之乳酸菌可抑制 *E. coli* BCRC 10450，但對 *S. aureus* BCRC 10451 則無抑制作用呈現類似之結果。Kizerwetter-Swida and Binek (2005) 指出，相較於大腸桿菌及沙門氏菌等革蘭氏陰性菌，乳酸菌較能抑制革蘭氏陽性菌 (如金黃色葡萄球菌及產氣莢膜梭狀芽孢桿菌)。本實驗結果亦可發現即使相同種別之菌株間其所呈現抗菌活性亦有差異，可能是部分菌株可分泌類細菌素 (bacteriocin-like)，而具有較佳抑制病原菌之能力 (de Angelis *et al.*, 2006)。有些乳酸菌則會產生抗菌蛋白，能取代抗生素治療動物之疾病感染 (Ryan *et al.*, 1989)。

表 7. 乳酸菌對指標病原菌之抗菌活性

Table 7. Antibacterial activities of lactic acid bacteria towards indicator pathogens

Strain No.	Inhibition of indicator pathogens*		
	<i>Escherichia coli</i> BCRC 10450	<i>Staphylococcus aureus</i> BCRC 10451	<i>Salmonella typhimurium</i> BCRC 10747
1-1	+	±	+
2-3	±	±	—
3-2	+	+	+
5-1	±	±	±
1-2A	±	+	±
2-1A	±	±	+
3-2A	±	—	—
4-2B	±	—	—
x-1d-2	±	—	—
x-1d-3'	±	—	—
LD-4w-1	±	±	±
LD-8w-1	±	—	—
x-3.4w-2	±	—	—
x-4w-1	±	±	—
C1W2-2	±	±	+
C1W1'-2	+	±	+
C1W2'-2	+	±	±
C1W3'-2	+	—	+

* Symbols: +, large inhibition zone (≥ 2 mm); ±, small inhibition zone (< 2 mm); —, no inhibition zone.

VI. 抗生素敏感性試驗

試驗中測試 9 種不同飼料中常用之抗生素進行乳酸菌之抗生素敏感性試驗，由表 8 結果可知 18 株乳酸菌對於 amoxycillin (25 μ g)、ampicillin (10 μ g) 及 florfenicol (30 μ g) 皆較無耐受性，產生之抑制圈可大於 20 mm，甚至是 40 mm 以上不等；菌株 2-3、4-2B、LD-4w-1 及 x-4w-1 對於 doxycycline 之耐受性較佳；菌株 2-1A、x-1d-2 及 x-1d-3' 對於 lincomycin 之耐受性較佳，且此三菌株皆為 *L. johnsonii*；菌株 5-1、1-2A、x-1d-2、x-1d-3'、LD-4w-1、C1W2-2、C1W1'-2 對 neomycin 之耐受性較佳；除菌株 x-4w-1 對 nalidixic acid 敏感外，其他菌株皆具耐受性；菌株 2-3、4-2B、x-1d-2、x-1d-3'、LD-8w-1 及 x-4w-1 對 oxytetracycline 之耐受性較佳；而菌株 5-1、1-2A、C1W2-2、C1W1'-2、C1W2'-2、C1W3'-2 對 streptomycin 之耐受性較佳。綜合各菌株對於不同抗生素之敏感性表現，菌株 x-1d-3' 相較其他菌株對 7 種抗生素具有較佳之耐受能力，而菌株 5-1、x-1d-2、C1W2'-2、C1W3'-2 則分別對 5 種不同之抗生素具有較佳之耐受性。Kaur *et al.* (2002) 指出乳酸菌對於 β -lactams (如 penicillins、cephalosporins 及 carbapenems 等)、aminoglycosides、cephalosporins 及 quinolones 具有耐受性。Kheadr (2006) 指出大多數乳酸菌可在 30 μ g/mL nalidixic acid 中存活，但在 25 μ g/mL amoxicillin、10 μ g/mL ampicillin 及 30 μ g/mL florfenicol 則否。本試驗顯示乳酸菌之抗生素敏感性可因所試菌種及使用抗生素型式之不同而有差異。

表 8. 九種抗生素對乳酸菌之抑菌圈直徑 (mm)

Table 8. Diameters (mm) of the halos obtained from lactic acid bacteria against nine tested antibiotics

Strain No.	Antibiotic*								
	AML	AMP	DO	FFL	MY	N	NA	OT	S
1-1	40	37	25	31	16	14	—	22	10
2-3	41	22	7	45	10	25	—	7	23
3-2	40	28	23	37	13	14	6	19	9
5-1	31	24	11	25	20	11	7	10	—
1-2A	31	27	13	29	19	11	—	12	8
2-1A	29	26	24	29	9	16	—	24	14
3-2A	32	30	11	34	12	17	7	10	13
4-2B	30	25	7	37	17	22	—	7	25
x-1d-2	27	22	14	31	9	10	7	9	13
x-1d-3'	28	23	13	29	7	11	—	7	13
LD-4w-1	33	33	15	38	28	11	8	8	12
LD-8w-1	46	36	—	42	11	12	—	—	18
x-3.4w-2	46	42	9	37	27	22	—	11	19
x-4w-1	46	34	—	45	12	42	40	7	10
C1W2-2	39	35	33	36	32	9	6	35	7
C1W1'-2	40	35	37	36	35	10	—	36	8
C1W2'-2	28	24	24	24	21	12	7	22	8
C1W3'-2	24	21	20	29	28	13	7	21	7

* AML, Amoxycillin (25 µg); AMP, Ampicillin (10 µg); DO, Doxycycline (30 µg); FFL, Florfenicol (30 µg); MY, Lincomycin (15 µg); N, Neomycin (30 µg); NA, Nalidixic acid (30 µg); OT, Oxytetracycline (30 µg); S, Streptomycin (10 µg)

結 論

本研究從雞糞、雛雞糞、雞腸道及豬糞等試樣中篩選出 38 株乳酸菌，並擇其中 18 株進行不同機能特性之分析，綜合各項特性優劣，菌株 3-2 (*L. reuteri*) 具有較佳耐膽鹽及抑菌能力；菌株 5-1 (*L. reuteri*)、x-1d-2 (*L. johnsonii*)、x-1d-3' (*L. johnsonii*) 具有較佳之酸及抗生素耐受性；菌株 C1W2'-2 (*P. acidilactici*)、C1W3'-2 (*P. pentosaceus*) 具有較佳之膽鹽及抗生素耐受性，後續針對特定菌株，將以細胞株平臺與畜禽動物進行體內外機能性測試。

參考文獻

- 林穎禎。2014。德國畜牧業中抗生素使用之規範發展。農政與農情 261：92-96。
- 鄧明中。2014。淺談豬流行性下痢之現況與防治方法。獸醫專訊 9：18-26。
- 光岡知足。1990。腸道フロ - ラと健康。New Food Industry 32(10): 1-8。
- Chang, Y. H., J. K. Kim, H. J. Kim, W. Y. Kim, Y. B. Kim and Y. H. Park. 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80: 193-199.
- Cho, J. H., P. Y. Zhao and I. H. Kim. 2011. Probiotics as a Dietary additive for pigs: a review. *J Anim. Vet. Adv.* 10(16): 2127-2134.
- de Angelis, M. D., S. Siragusa, M. Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M. Amerio, A. Grandi, A. Ragni and M. Gobbetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res. Microbiol.* 157: 792-801.
- de Angelis, M. D., S. Siragusa, L. Caputo, A. Ragni, R. Burzigotti and M. Gobbetti. 2007. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Vet. Microbiol.* 123: 133-144.

- Hardie, J. M. 1986. Genus *Streptococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2, pp. 1043-1071.
- Kandler, O. N. and D. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2, pp. 1209-1234.
- Kaur, I. P., K. Chopra and A. Saini. 2002. Probiotics: Potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15: 1-9.
- Kheadr, E. E. 2006. Impact of acid and ox gall on antibiotic susceptibility of probiotic *Lactobacilli*. Afr. J. Agric. Res. 5: 172-181.
- Kim, P. I., M. Y. Jung, Y. H. Chang, S. Kim, S. J. Kim and Y. H. Park. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 1103-1111.
- Kizerwetter-Swida, M. and M. Binek. 2005. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. Pol. J. Microbiol. 54: 287-294.
- Korhonen, J. M., Y. Sclivagnotis and A. von Wright. 2007. Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglet. J. Appl. Microbiol. 103: 2496-2503.
- Marroki, A., M. Zúñiga, M. Kihal and G. P. Martínez. 2011. Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties. Braz. J. Microbiol. 42(1): 158-171.
- Oyetayo, V. O. 2004. Phenotypic characterisation and assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. Afr. J. Biotechnol. 3: 55-57.
- Pidoux, M., V. M. Marshall, P. Zanoni and B. Brooker. 1990. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. J. Appl. Bacteriol. 69: 311-320.
- Ozgun, D. and H. C. Vural. 2011. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. J. Med. Genet. Genomics 3(3): 46-49.
- Rammelsberg, M. and F. Radler. 1990. Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bact. 69: 177-184.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross and C. Hill. 1989. Evaluation of lactacin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2287-2290.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mäntö and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.
- SAS. 1996. SAS User's Guide: Statistics, Release 6.12, ed., SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Shahzadi, T., M. A. Abbasi, T. Riaz, A.U. Rehman, S. Z. and M. Ajaib. 2011. *Caryopteris odorata*: A rich source of antioxidants for protection against chronic disease and food products. J. Chil. Chem. Soc. vol. 56.
- Taheri, H. R., H. Moravej, F. Tabandeh, M. Zaghari and M. Shivazad. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poult. Sci. 88: 1586-93.
- Toit, M., C. M. A. P. Franz, L. M. T. Dicks, U. Schillinger and W. H. Holzapfel. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Int. J. Food Microbiol. 40: 93-104.
- Yeung, P. S., M. E. Sanders, C. L. Kitts, R. Cano and P. S. Tong. 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains. J. Dairy Sci. 85: 1039-1051.
- Zavaglia, A. G., G. Kociubinski, P. Perez and G. de Antoni. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. J. Food Prot. 61(7): 865-873.

Isolation and characterization of lactic acid bacteria used as feed additives ⁽¹⁾

Ching-Yun Kuo ⁽²⁾ Rung-Jen Tu ⁽²⁾ Chien-Jung Huang ⁽²⁾ Fang-Chueh Liu ⁽³⁾
His-Chia Chen ⁽⁴⁾ Ming-Ju Chen ⁽⁵⁾ and Yu-Chun Lin ⁽²⁾⁽⁶⁾

Received: Oct. 20, 2014; Accepted: May 8, 2015

Abstract

The objective of this study was to isolate the potential lactic acid bacteria strains with functional properties from animal and further used them as feed additives to promote the benefit in the livestock production. The lactic acid bacteria after isolation from intestinal canal of chicken, feces of chicken and pig were identified by API 50 CHL kits and 38 strains were screened in the experiment. Eighteen isolated LAB strains with higher enzyme activities were further identified as *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *L.b. mucosae*, *L.b. casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* by full sequence analysis of 16S rDNA and screened for their probiotic properties. Comparing the results obtained from 18 LAB isolates, strain 3-2 had high bile tolerance and antibacterial activity; strain 5-1, x-1d-2 and x-1d-3' had high low pH tolerance and antibiotic resistance; strain C1W2'-2 and C1W3'-2 had high bile tolerance and antibiotic resistance. The findings in this study provided a strong basis for exploring the potential of animal LAB isolates to be used in feeding as probiotic additives.

Key words: Lactic acid bacteria, Bio-feed, Functional properties.

(1) Contribution No. 2231 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Products Processing Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(4) Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei 100, Taiwan, R.O.C.

(5) Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

(6) Corresponding author. E-mail: hiujj@mail.tlri.gov.tw.